

PAPER DETAILS

TITLE: Implantasyon Uygulamalari İçin Toz Metalurjisi ile Üretilen Ti-16Nb-4Sn Alasiminin Mikroyapi ve Biyouyumluluk Özelliklerinin Incelenmesi

AUTHORS: Ömer ÇAKMAK,Mehmet KAYA,Ebru ANNAÇ,Mustafa KÖM

PAGES: 29-40

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1874068>

Investigation of Microstructure and Biocompatibility Properties of Ti-16Nb-4Sn Alloy Produced by Powder Metallurgy for Implantation Applications

Ömer Çakmak^a, Mehmet Kaya^{*b}, Ebru Elibol Annac, Mustafa Köm^d

Submitted: 10.07.2021 Revised: 31.08.2021 Accepted: 22.01.2022 doi:10.30855/gmbd.2022.01.03

ABSTRACT

Keywords: TiNbSn alloys, Porous biomaterials, Microstructure

^a Pohang University of Science and Technology (POSTECH),
Dept. of Advanced Nuclear Power Engineering,
37673 - POHANG, South Korea
Orcid: 0000-0001-5983-6783

^b Tekirdağ Namık Kemal University,
Çorlu Vocational School,
Depart. of Machinery and Metal Technologies,
59850 - ÇORLU, TEKİRDAĞ, Türkiye
Orcid: 0000-0001-9710-2254

^c Adıyaman University,
Faculty of Medicine,
Department of Histology,
02100 - ADIYAMAN, Türkiye
Orcid: 0000-0001-9726-5846

^d Fırat University,
Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Surgery,
23100 - ELAZIĞ, Türkiye
Orcid: 0000-0001-5026-9559

*Corresponding author:
mehmetkaya75@hotmail.com

Anahtar Kelimeler: TiNbSn Alaşımları, Gözenekli Biyomalzemeler, Mikroyapı

In this study, Ti-16Nb-4Sn ternary alloy was produced as two different porosity by conventional powder metallurgy method. During production, ammonium bicarbonate was used as a volatile additive to increase the porosity. Considering the mass and size dimensions of the samples, the general porosities were determined as 13.62 and 56.32%. Phase analysis and changes in microstructure of sintered samples were examined using XRD, optical microscope, SEM-EDS techniques. In XRD analysis results, it was determined that the structure consisted of β and α phases. As a result of SEM-EDS examinations, it was determined that the structure consisted of two types of morphology: dark grey belonging to α phase and light grey belonging to β phase. The strengths of the samples were examined by performing a uniaxial compression test. As expected, it was determined that the compressive strength of the samples decreased with the increased porosity. Biocompatibility properties of samples with ideal pores in terms of biocompatibility (multi-porous) were examined in vivo using Sprague Dawley female rat. It was determined that there was no toxic and allergic interaction at the implantation site. Thus, it is predicted that the samples can be used as an ideal implant material in terms of biocompatibility.

İmplantasyon Uygulamaları İçin Toz Metalurjisi ile Üretilen Ti-16Nb-4Sn Alaışımının Mikroyapı ve Biyoyoumluluk Özelliklerinin İncelenmesi

ÖZ

Bu çalışmada, Ti-16Nb-4Sn üçlü alaşımı iki farklı gözenekli olarak geleneksel toz metalurjisi yöntemi ile üretildi. Üretim sırasında, gözenek oranının artırılması amacıyla amonyum bikarbonat uçucu katkı malzemesi olarak kullanıldı. Numunelerin kütle ve boyut ölçüleri dikkate alınarak genel gözenek oranları %13.62 ve %56.32 olarak belirlendi. Sinterlenen numunelerin faz analizleri ve mikroyapılarında meydana gelen değişimler; XRD, optik mikroskop, SEM-EDS teknikleri kullanılarak incelendi. XRD analiz sonuçlarında yapının β ve α fazlarından oluştuğu tespit edildi. SEM-EDS incelemeleri sonucunda yapının, α fazına ait koyu gri ve β fazına ait açık gri olmak üzere iki tür morfolojiden oluştuğu tespit edildi. Numunelerin mukavemetleri tek eksenli basma testi yapılarak incelendi. Numunelerin gözenek oranının artması ile beklendiği gibi basma dayanımlarının azaldığı belirlendi. Biyoyoumluluk açısından ideal gözenek olan (çok gözenekli) numunelerin in vivo ortamda biyoyoumluluk özellikleri Sprague Dawley dişi sıçan kullanılarak incelendi. implantasyon bölgesinde toksik ve alerjik etkileşimin olmadığı tespit edildi. Böylece numunelerin biyoyoumluluk açısından ideal bir implant malzemesi olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

1. Giriş (Introduction)

Biyomalzemeler insan vücudunda özellikle diş ve iskelet sistemleri için kullanılmaktadır. Son zamanlarda, ortopedik uygulamalar için plaka, yapay eklem ve vida gibi yük taşıyan implant malzemelerine yönelik artan bir talep vardır. Titanyum (Ti) ve alaşımları, yüksek korozyon direnci, iyi mekanik özellikleri ve yüksek biyoyumlulukları nedeniyle uzun süredir sert doku implant malzemesi olarak kullanılmaktadır [1-5]. NiTi ve Ti6Al4V gibi Ti-esaslı alaşımlar genellikle biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Ancak vanadyumun toksisitesi, nikel ve alüminyumun vücutta alerjik reaksiyona neden olması nedeniyle vanadyum, nikel ve alüminyum içermeyen implant malzemelerin üretimi hedeflenmektedir. Ayrıca, bu malzemeler kortikal kemiğe (10–30 GPa) kıyasla çok daha yüksek elastik modülüne ve sertliğe sahiptir. Bu nedenle, kullanım sırasında kemik kaybına ve implantın aşınmasına neden olabilmektedir [6-10]. β -tipi Ti alaşımları, biyomedikal uygulamalarda oldukça avantajlıdır. Bu alaşımlar, β -stabilizatörleri ve daha düşük miktarlarda α -stabilizatörleri içerdiğinden daha düşük bir elastik modüle sahiptir. Bu durum kemik ile implant arasındaki mekanik uyumsuzluğu azaltmaktadır. Literatürde yapılan araştırmaya göre, β -tipi TiNbSn alaşımının Ti6Al4V alaşımına kıyasla deneysel bir modelde daha iyi biyoyumluluk ve kemik indüksiyon yeteneği sergilediği görülmektedir. Ti-Nb alaşımlarına az miktarda Sn eklemek, bu alaşımların basma dayanımını arttırmaktadır. Ayrıca, saf Sn'in antibakteriyel özellikler sergilediği ve Ti-Nb alaşımlarına Sn eklenmesinin korozyon dayanıklılığını arttırdığı bilinmektedir [11-14].

Ti-esaslı alaşımlar, mikrodalga sinterleme (MWS), metal enjeksiyon kalıplama, kıvılcım-plazma sinterleme, sıcak izostatik presleme ve geleneksel sinterleme, kendi ilerleyen yüksek sıcaklık sentezi (SHS,) gibi çeşitli toz metalurjisi yöntemleriyle üretilebilmektedir. Geleneksel sinterleme tekniği, düşük işleme maliyeti, gelişmiş difüzyon süreci ve kontrol edilebilir mekanik ve fiziksel özellikler nedeniyle son zamanlarda popüler hale gelmiştir [15-19]. Ti-esaslı alaşımlarda yüksek Nb ve Sn oranlarının sünekliliğe neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca Ti alaşımlarına eklenen düşük oranlarda Nb, Zr ve Sn elementleri çift lamelli faz yapısı oluşturarak alaşımın mukavemetini arttırdığı bilinmektedir [13,20,21]. Bu nedenle, sert doku implantı olarak kullanılmak üzere gözenekli Ti-16Nb-4Sn alaşımı farklı gözeneklerde üretildi. Gözenek oranının numunelerin mikroyapı ve mekanik özellikler üzerindeki etkisi incelendi. Ayrıca çok gözenekli numunelerin in vivo ortamda biyoyumluluk özellikleri incelenerek ideal implant malzemesi ile karşılaştırıldı.

2. Materyal Metot (Material And Method)

2.1. TiNbSn Alaşımlarının Üretimi (Production of TiNbSn Alloys)

Ti-16Nb-4Sn (% at.) üçlü alaşımını üretmek için, numunelerin üretiminde kullanılan tozlar Alfa Aesar (Almanya) firmasına ait ve yurtiçi alım ile temin edilmiştir. Tozların ve elementlerin bazı özellikleri Tablo 1'deki gibidir.

Tablo 1. Numune üretiminde kullanılan tozların ve elementlerin bazı özellikler.

Malzeme Özellikleri	Titanyum (Ti)	Niyobyum (Nb)	Kalay (Sn)
Kütle olarak saflık derecesi (%)	99.5	99.8	99.9
Toz boyutu (μm)	-44	-5	-44
Yoğun halde özgül ağırlığı (gr/cm^3)	4.507	8.4	7.31
Atom kütlesi (gr/mol)	47.9	92.9	118.71
Atom numarası	22	41	50
Atom çapı (Å)	2	2.08	1.45
Ergime sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)	1668	2469	231.93
Kaynama sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)	3287	4744	2602
Kristal yapıları	Hegzagonal, 882 $^{\circ}\text{C}$ üzeri BCC	Hacim merkezli kübik (BCC)	Tetragonal

Başlangıç olarak, belirli oranlardaki tozlar, homojen bir karışım elde etmek için özel olarak tasarlanmış döner bir kaptan 24 dev/dk ve 12 saat boyunca karıştırıldı. Yapıdaki gözenek miktarını ayarlamak için amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3) kullanıldı. Bu kapsamda, iki farklı gözenek miktarına (az ve çok gözenekli numuneler) sahip alaşımlar elde edildi. Az gözenekli numuneler üretmek için, toz karışımı 10 mm çapında ve yaklaşık 15 mm uzunluğunda olacak şekilde 300 MPa basınç ile silindirik olarak preslendi. Daha sonra preslenen numuneler argon gazlı ortamda 5 $^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızında 1200 $^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar ısıtıldı ve 2 saat bekletildi. İkinci olarak, çok gözenekli bir yapıya sahip numuneler imal etmek için, Ti-16Nb-4Sn karışımına %30 (ağırlıkça) amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3) ilave edilerek

karıştırıldı ve az gözenekli örneklerle aynı boyut ve değerlerde preslendi. Çok gözenekli numuneler için iki aşamalı sinterleme yapıldı. Öncelikle briketlenmiş ham numunelerdeki amonyum bikarbonat yakılarak çok gözenekli bir yapı oluşturmak için 180  C'de 2 saat bekletildi. İkinci sinterleme aşaması, az gözenekli numunelerle aynı değerlere sahiptir. Son olarak, sinterlenmiş numunelerin gözenekliliği, aşağıdaki matematiksel denklemler kullanılarak hesaplandı [21]. Boşluk içermeyen ideal bir kristal yapının teorik yoğunluğu birim hücredeki atom sayısı, atom kütlesi ve birim hücre boyutu dikkate alınarak hesaplanır. İkili veya   l  elementlerle alaşım oluşturma durumunda alaşımın çoğunlukla farklı fazlardan oluşacağı ve oluşacak bazı fazlardaki birim hücrelerin farklı cins atomlar içereceği ve böylece birim hücre boyutunun değişeceği bir gerçektir. Farklı fazlar içeren bir alaşımda fazların tam olarak yüzdelik dağılımlarının bilinmesi ve birim hücrelerdeki atom sayılarının da tam olarak belirlenmesi mümkün olamayacağından birim hücreye ve atom sayısına dayalı teorik yoğunluğun hesaplanması zordur. Bu nedenle teorik yoğunluk hesaplanması yapılırken alaşımın yoğun katı çözeltiden ibaret olduğu d ş n l rek aşağıdaki denklemde belirtildiği gibi genel olarak teorik yoğunluk (ρ_o) her elementin kütlesi ve yoğunluğu dikkate alınarak oluşabilecek karışımın yoğunluğu hesaplanmaktadır. Alaşım durumunda bazı elementlerin atomları farklı cins birim hücre içerisinde yer alabilmesi düşünüldüğünde ve böylece alaşım durumunda numune boyutları da azalacağı için aslında gerçek teorik yoğunluk aşağıdaki denklem ile hesaplanandan daha büyük olacağı bir gerçektir. Numunelerin sinterleme öncesi görünür yoğunlukları dikkate alınmazken sinterleme sonrası üretilen numunelerin nihai yoğunlukları ise numune kütleleri ve silindir numunelerin hacimleri hesaplanarak belirlendi. Burada belirtilen gözenek açık ve kapalı gözeneklerin toplamı olan genel gözenek oranıdır. Ayrıca açık gözenek oranı da hesaplanmak istenirse dereceli bir kap içerisinde numuneler sıvıya daldırılarak (Arşimed prensibi) da hesaplanabilir [20].

$$\rho_o = \frac{m_{Ti} + m_{Nb} + m_{Sn}}{V_{Ti} + V_{Nb} + V_{Sn}} \quad \text{and} \quad \rho = \frac{m}{V} \quad \varepsilon = \left(1 - \frac{\rho}{\rho_o}\right) * 100 \quad (1)$$

m = Kütle (gr)

ε = Gözeneklilik miktarı (%)

v = Hacim (cm³)

ρ = ölçülen yoğunluk (gr/cm³)

ρ_o =  zk tle (gr/cm³)

ρ_o = Teorik yoğunluk (gr/cm³)

2.2. Mikroyapı ve Mekanik  zelliklerin  ncelenmesi (Investigation of Microstructure and Mechanical Properties)

Mikroyapısal  zellikler, optik mikroskopi (OM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) (R ntec EDO donanımlı Evo-40Vp) kullanılarak analiz edildi. Mikroyapısal değişimleri tespit etmek için numunelerin arakesit yüzeyleri 80-2500 mesh'lik silisyum karbür zımpara kağıtlarıyla zımparalandı. Zımparalanmış yüzeyler sırasıyla 5 ve 1 mikrometrelik elmas süspansiyonla parlatıldı. Daha sonra, numunelerin yüzeyleri Kroll solüsyonu (3 mL HF, 6 mL HNO₃ ve 91 mL H₂O) kullanılarak dağlandı. Numunelerin faz analizleri, X-ışını kırınım yöntemi (XRD) (Rigaku Rad-B D-Max 2000) ile Cu-K  radyasyonu kullanılarak ve 6  dk⁻¹ adım hızında 30  ile 80  arasında taranarak yapıldı. Basma test numuneleri EN 24506 standardına göre hazırlandı ve oda sıcaklığında Instron test makinesi kullanılarak basma dayanımları belirlendi.

2.3. Hayvan Deneyleri (Animal Experiments)

Ti-16Nb-4Sn alaşım numunelerinin biyoyumluluk özelliklerinin incelenmesi amacıyla Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden (F DAM) hayvan deneyleri için etik onay (Etik kurul raporu (2016/138)) alındı. Yaklaşık 300 g ağırlığında ve 6 aylık 6 adet Sprague Dawley dişi sıçan biyoyumluluk testleri için kullanıldı. Deney hayvanlarının sol arka bacaklarının kemik dokusuna silindirik şekilli, yaklaşık 2x1 mm boyutunda ve 30 mg ağırlığında çok gözenekli Ti-16Nb-4Sn numuneleri yerleştirildi. Bu çalışmanın implantasyon işlemlerinde, köpek, keçi veya tavşan yerine sıçan tercih edildi. Bunun en büyük nedeni, sıçanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmaların daha az zaman ve daha az implant materyali gerektirmesidir [21].

Ameliyat  ncesi hayvanların anestezisi için 1.5 ml/10 kg Rompun (Bayer, Xylazine hidroklorür 23.32 mg/ml) ve yaklaşık 5 dakika sonra 1.5 ml/10 kg intramüsküler Ketals (Park-Davis Ketamin hidroklorür 50 mg/ml) ilaçlar kullanıldı. İmplantasyon için sol arka bacağın kaval kemiği seçildikten sonra, deri ve deri altı doku kesildi ve yaklaşık 2 cm uzunluğunda periost açıldı ve kemik korteksi 2.7 mm Steinman iğnesi ile delindi. Delme işlemi sırasında bacağa zarar vermemek için serum kemiğe püskürtüldü.

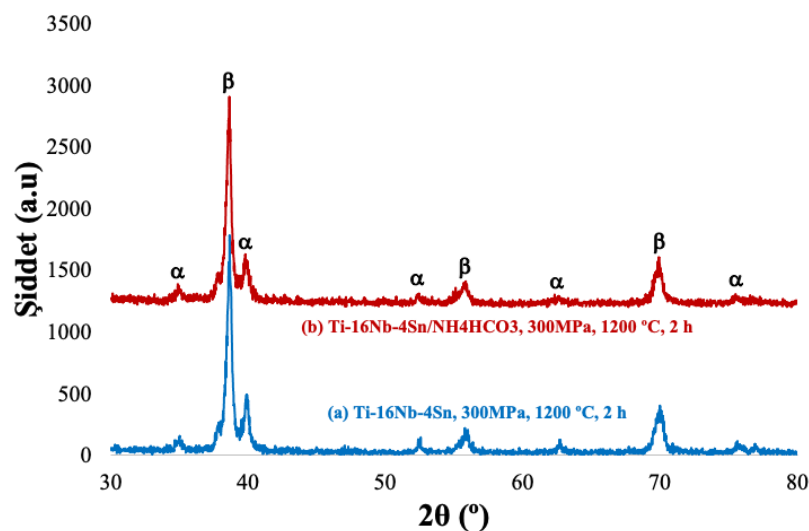
Hazırlanan küçük implantlar, sol arka bacağın kaval kemiğine implante edilmeden önce alkol, serum ve aseton ile temizlendi. İmplantların tibiaya yerleştirilmesinden sonra cerrahi yara, kaslar ve deri altı bağ dokusu 2/0 kromatik katgüt ile kapatıldı. Son olarak 1 numaralı ipek iplikle deri dikildi. Bacakları implante edilen hayvanlara antibiyotik ve ağrı kesici uygulanarak 45 gün kontrol altında tutuldu. Ameliyat sonrası hayvanlara 3 gün boyunca, antibiyotik ve ağrı kesici olarak kas içerisine 20 mg/kg cefazolin sodium (cefamezin 500 mg; Eczacıbaşı, İstanbul, Turkey) ve 3 mg/kg ketoprofen (profenid 100 mg; Eczacıbaşı, İstanbul, Turkey) uygulandı. 45 günlük sürenin ardından hayvanlara ötenazi uygulandı ve implantların yerleştirildiği alanlar cerrahi prosedürle dikkatlice çıkarıldı. Alınan tibiadan greftin uygulandığı bölgede kemik parçası çıkarıldı ve koruma için formaldehit solüsyonuna (%10) yerleştirildi [22].

2.4. Histopatolojik Analiz (Histopathological Analysis)

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji laboratuvarında histopatolojik analiz yapıldı. Kurban edilen ratlardan alınan kemik örnekleri, 3 gün boyunca %10 nötr formaldehit içinde muhafaza edildi ve daha sonra, dekalsifikasyon için %20 formik asit ve hidroklorik asit karışımı içeren bir çözelti içine alındı. Solüsyonun rejenerasyonu sırasında her 2 günde bir, kemik örnekleri, kireç çözme işleminin tamamlanıp tamamlanmadığını görmek için iğneyle dokunarak kontrol edildi. Bir ay süreyle dekalsifikasyon yapılan kemik dokuları, 12 saat yıkama sonrası dehidrasyon ve şeffaflık ile parafin bloklara gömüldü. Parafine gömülü örnekler, bir mikrotom kullanılarak 5.0 µm kalınlığında seri kesitler halinde kesildi ve alınan kesitler, Hematoksilen-Eosin ve Masson Trichrome boyama kitleri ile boyandı. Histopatolojik analiz için, alınan kesitler ışık mikroskobu (DiaStar, Reichert & Jung Products, Leica, Almanya) kullanılarak analiz edildi ve görüntüler bir dijital kamera (Carl Zeiss Axiocam ERc 5s, Almanya) ile çekildi. Değerlendirmelerde yeni kemik dokusu büyümesi, kemik gövdesinin her tarafında osteoblastik hücre aktiviteleri, damarlanmada varyasyon, bağ dokusunun kollajen lifli bölgesi ve fibroblast hücreleri dikkate alındı [22].

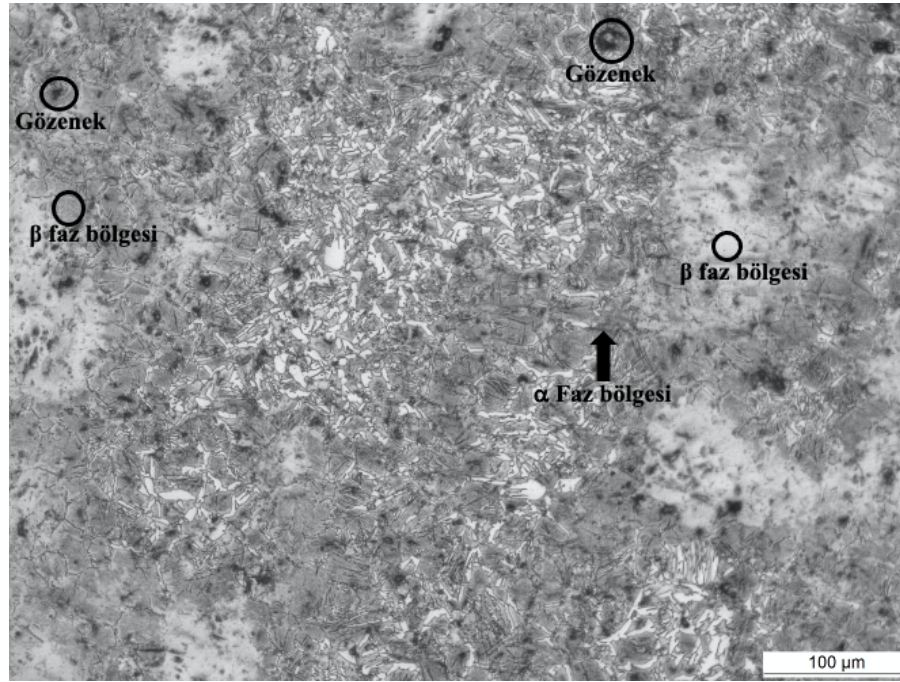
3. Bulgular ve Tartışma (Findings And Discussion)

Numunelerin üretimi deneysel kısımda belirtildiği gibi iki farklı gözenekli (%13.62 az gözenek ve %56.32 çok gözenek) genel gözenekli olacak şekilde argon ortamında sinterlenerek üretildi. Sinterlenen farklı gözenek oranlarına sahip Ti alaşımlarının XRD desenleri Şekil 1'de gösterilmektedir. XRD desenlerinden anlaşılabileceği üzere dominant olan β (yüzey merkezli kübik; fcc) fazının yanı sıra α (hegzagonal sıkı paket; hcp) fazı tanımlandı. Literatürde, toz enjeksiyon kalıplama yöntemiyle üretilen Ti-16Nb-XSn (X: ağırlıkça %0,2,4) alaşımlarında da benzer XRD fazlarının varlığı bildirilmiştir [23]. Gözenek oranının Ti-16Nb-4Sn alaşımlarının faz yapısı üzerinde etkisinin olduğu görülmektedir. Buna göre, azalan gözenek oranına bağlı olarak pik şiddeti artmaktadır. Bu durum yapının kristalleşme özelliğinin azalan gözenek ile artmasından kaynaklanmaktadır. SEM görüntülerine bakıldığında da bu olay açık bir şekilde görülmektedir.

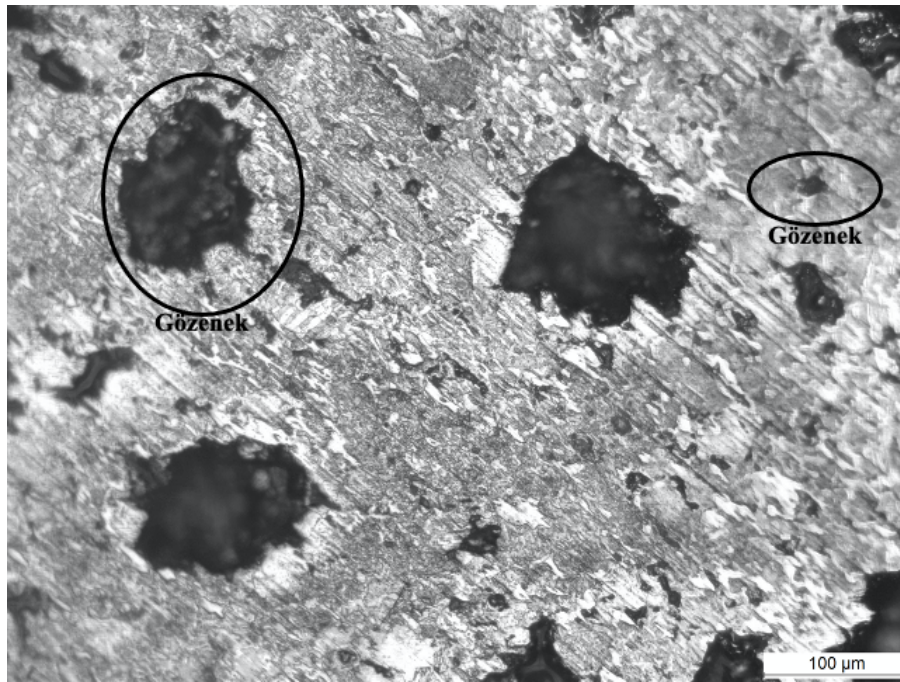


Şekil 1. Ti-16Nb-4Sn numunelerinin X-ışını kırınım modelleri, (a) Az gözenekli numune ve (b) Çok gözenekli numune modelleri (X-ray diffraction patterns of Ti-16Nb-4Sn samples, (a) Less porous sample and (b) Highly porous sample)

Şekil 2’de farklı gözenek oranlarına sahip Ti-16Nb-4Sn alaşımlarının optik görüntüleri görülmektedir. Optik mikroskobu görüntülerindeki siyah bölgeler ki bunların bazıları Şekil 2(a,b) üzerinde belirtildiği gibi gözenekleri göstermekte ve bu gözenekler genel olarak kapalı şekildedir. Yine şekil 2(a) üzerinde belirtildiği gibi açık gri ve koyu gri gibi yapının genel olarak iki farklı fazdan ibaret olduğu anlaşılmaktadır. Bu fazların SEM-EDX ve XRD analizi ile α ve β fazlarına ait olduğu anlaşılmaktadır. Gözenek oranı azaldıkça yapının daha homojen olduğu görülmektedir. Düşük gözenek oranına sahip numunelerde taneciklerin etkileşimi ve difüzyonu daha kolaydır. Bu nedenle partiküller birbirleriyle etkileşerek küçülürler. Ayrıca, alaşımın Optik ve SEM görüntülerinde dubleks mikroyapılar görülmektedir. Çift katmanlı yapılar olarak görülen bu yapılar α ve β fazlarından oluşmaktadır.



(a)



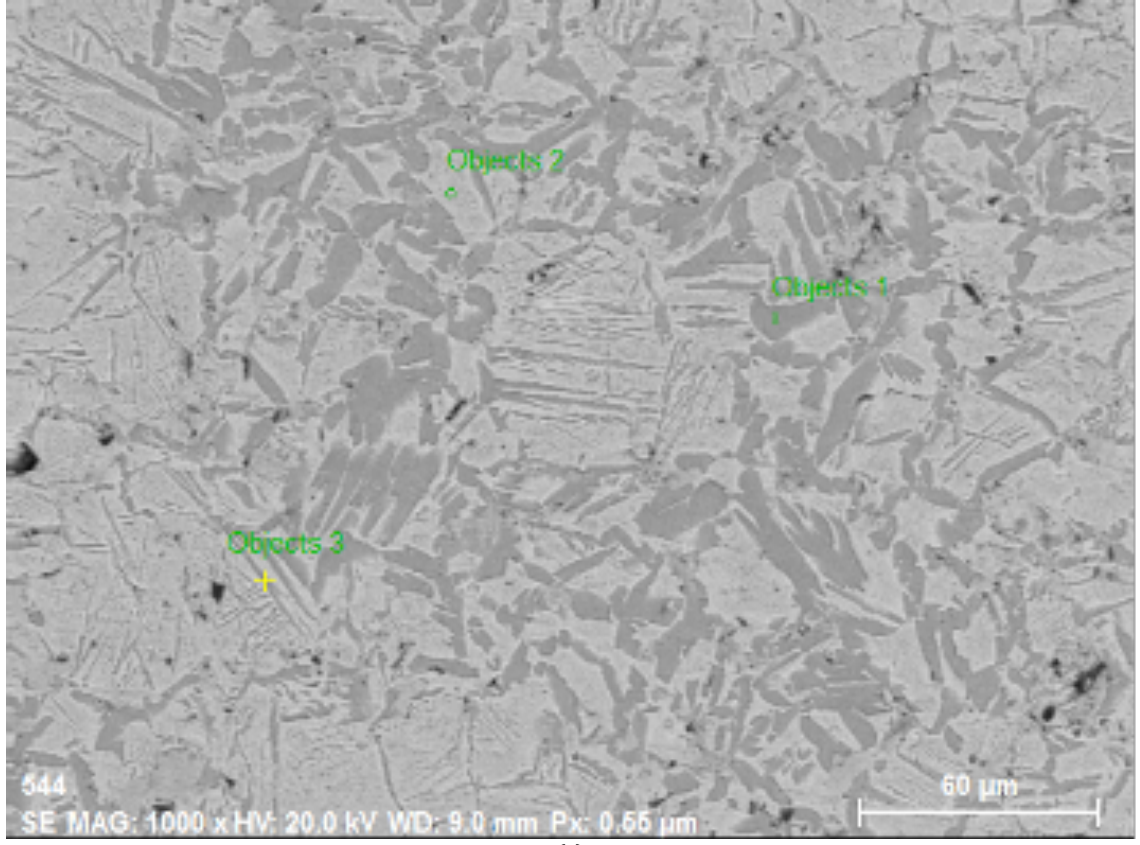
(b)

Şekil 2. Ti-16Nb-4Sn numunelerinin optik mikroyapıları, (a) Az gözenekli numune ve (b) Çok gözenekli numune
(Optical micrographs of Ti-16Nb-4Sn samples, (a) Less porous sample) and (b) Highly porous sample)

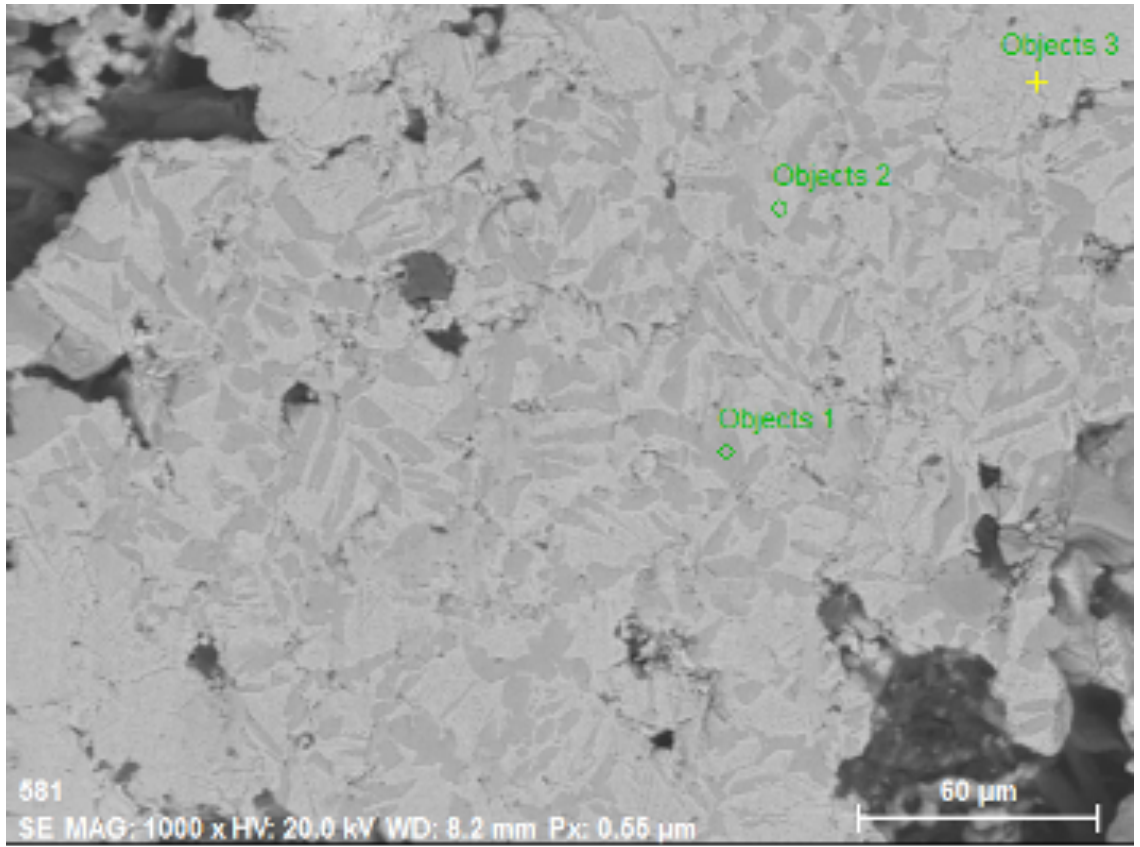
Şekil 3 (a) ve (b) 'de gösterildiği gibi farklı gözenek oranı ile üretilen Ti-6Nb-4Sn alaşımlarının mikro morfolojisi SEM kullanılarak incelenmiştir. SEM görüntülerinde açık gri ve koyu gri renkli benzer yapıların varlığı ve siyah renkli gözeneklerin varlığı dikkat çekmektedir. İkili Ti-Nb denge diyagramına göre Ti-16Nb atomik oranı dikkate alındığında sinterleme işlemi sırasında sıvı fazın oluşması mümkün olmayıp katı-durum sinterleme işlemi söz konusudur. Benzer şekilde ikili Ti-%4Sn veya Nb-%4Sn atomik oranları dikkate alındığında 1200 °C'de katı-durum sinterlemesi beklenir ancak kalayın ergime sıcaklığı çok düşük olduğundan daha düşük sıcaklıklarda atomik difüzyon neticesi ile farklı intermetalik bileşikler olabilir. Bu durum sinterleme sıcaklığına ulaşmak için ısıtma hızının yeterince düşük (< 5 °C/dakika) tutulması ile belki önlenabilir, aksi durumda sıvı-faz sinterleme işlemi gerçekleşmiş olur ve böylece daha düşük ötektik ergime sıcaklıklarında yarı kararlı intermetalik fazlar oluşur.

Sinterleme sıcaklığının artması durumunda sıvı-faz sinterlenmesi neticesi ile atomik difüzyonun daha kolay olmasından kaynaklı düşük sıcaklıklarda oluşan yarı kararlı fazların çoğunluğu ve sinterleme süresinin fazla olması durumunda hepsi kaybolur. Toz metalürjisi ile üretilen gözenekli numunelerde sıvı faz sinterlemesi durumunda gözeneklerin çoğu büzülerek numuneler yoğunlaşır. Ergime neticesi ile numunelerin yoğunlaşması durumu toz karışımı içerisinde gözenek yapıcı malzeme kullanılmaması durumunda daha belirgin olur. Sinterleme sıcaklığının artması neticesi ile düşük sıcaklıklarda oluşan yarı kararlı fazların kaybolması esnasında ilk önce σ fazı ve sonra matrisin titanyum olması neticesi ile β fazı oluşabilir. Nb atomlarının Ti matrisi içerisinde kolay difüzyona uğrayabilmesi için sinterleme sıcaklığı yeterince arttırılırsa β fazı oluşur. Zhao ve ark. [24] tarafından yapılan bir çalışmada 900-1100 °C sinterleme sıcaklığının β fazının oluşması için yeterli olmadığı belirtilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda sinterleme ile oluşan β fazı numunenin soğuması durumunda çözünmeye başlar ve tane sınırlarında σ fazının oluşması beklenir. Böylece σ ve β fazlarının bir arada olması sonucu Widmanstatten lamelli yapı oluşur ki bu durumda numunelerin mekanik dayanımı artar. SEM görüntülerine bakıldığı zaman bazı bölgelerde σ ve β fazlarının lamelli yapısının (Widmanstatten yapısı) olduğu görülmektedir. Benzer görüntüler Yılmaz ve ark. [23] tarafından 1200 °C de sinterlenme ile üretilen gözenekli Ti-16Nb-4Sn alaışımının SEM görüntülerinden de belirtilmektedir. Xie ve ark. [25] tarafından plazma sinterleme yöntemiyle üretilen %7.1, %30, %40, %50 ve %60 gözenekliliğe sahip $\text{Ti}_{45}\text{Zr}_{10}\text{Cu}_{31}\text{Pd}_{10}\text{Sn}_4$ alaşım numunelerinin SEM incelemesinde de benzer sonuçlar belirtilmektedir. Ayrıca, gözenek oranı azaldıkça lamel kalınlığının da azaldığını ve iğne benzeri morfolojilerin oluştuğunu belirtmektedirler.

SEM görüntülerinde farklı bölgelerden alınan Object-1, Object-2 ve Object-3 olarak gösterilen detaylı EDS sonuçları Tablo-2'de gösterilmektedir. Az ve çok gözenekli numunelerin yapıları esas olarak iki fazdan oluşmaktadır. İlk olarak, object-1 (elips) ve object-3 (nokta) olarak gösterilen koyu gri bölgeler α -fazına aittir. İkinci olarak, açık gri ve daha geniş şekilde görünen bölgeler (object-2) ise β -fazına aittir. Object-1 ve object-3 aynı faz (α -fazı) olmasına rağmen farklı bölgelerde alındığı için niyobyum atomik oranlarında belirgin farklılıklar vardır. Bunun nedeni tam olarak anlaşılmamakla birlikte, kalayın ergime sıcaklığının düşük olması neticesi ile düşük sıcaklıkta yarıkararlı intermetalik fazların oluştuğu ve zamanla sıcaklığın artması sonucu niyobyum içerikli yarıkararlı fazların kaybolarak niyobyum ağırlıklı α -fazının oluştuğu ve böylece ince koyu α -lamellerin oluştuğu düşünülmektedir. Çünkü XRD desenlerinde sadece α ve β fazları bulunmaktadır. Benzer SEM-EDS analizi sonuçları İbrahim ve ark. [26] tarafından mikrodalga sinterleme (MDS) yöntemi ile üretilen Ti-16Nb-XSn (% X: 0, 0.25, 0.5, 1.5) örneklerinde de belirtilmektedir. Ayrıca, Li ve ark. [27] tarafından ark ergitme yöntemiyle üretilen $\text{Ti}_{85-x}\text{Nb}_{10+x}\text{Sn}_5$ ($x=0,3,6,10\%$ at.) örneklerde de benzer mikroyapılar gösterilmektedir. Ergitme ile üretilen TiNbSn numunelerinde hızlı soğuma sonucu α ve β fazlarına ilaveten α' (hegzagonal martensit) ve α'' (ortorombik martensit) fazlarının da oluştuğu bazı çalışmalarda belirtilmektedir [28].



(a)



(b)

Şekil 3. Ti-16Nb-4Sn numunelerinin SEM mikrografları, (a) Az gözenekli ve (b) çok gözenekli numune
(SEM micrographs of Ti-16Nb-4Sn samples, (a) Less porous sample and (b) Highly porous sample)

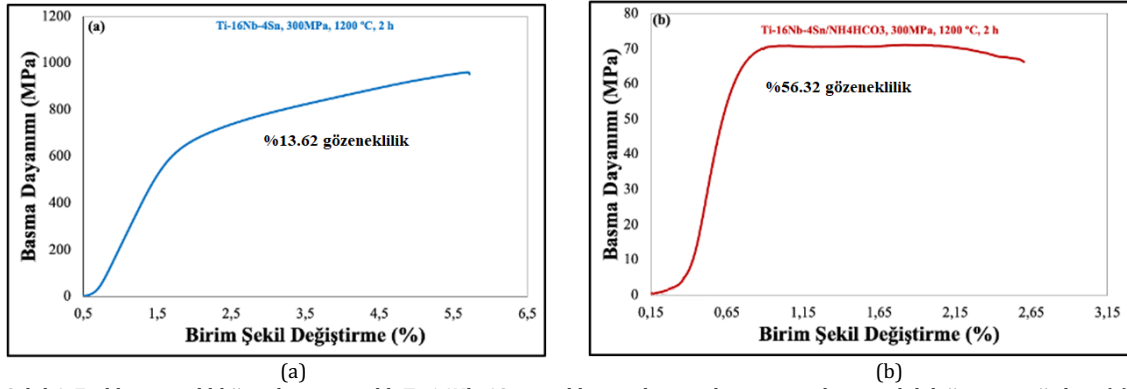
Tablo 2. EDX analizi sonucunda farklı bölgelerden alınan ağırlık ve atomik oranlar
(Weight and atomic ratios taken from different regions as a result of EDX analysis)

	Elementler	% Kütle (Az gözenekli) (a)	% Atomik (Az gözenekli) (a)	% Kütle (Çok gözenekli) (b)	% Atomik (Çok gözenekli) (b)
<i>Objects-1 (elips)</i>	Ti	88.33	94.31	86.32	93.56
	Nb	6.10	2.63	8.37	3.65
	Sn	5.57	3.07	5.01	2.79
<i>Objects-2 (elips)</i>	Ti	70.69	83.26	69.20	82.13
	Nb	21.31	12.93	23.53	14.39
	Sn	8.01	3.80	7.27	3.48
<i>Objects-3 (nokta)</i>	Ti	78.01	88.07	82.37	90.66
	Nb	15.18	8.83	12.28	6.96
	Sn	3.10	3.10	5.35	2.38

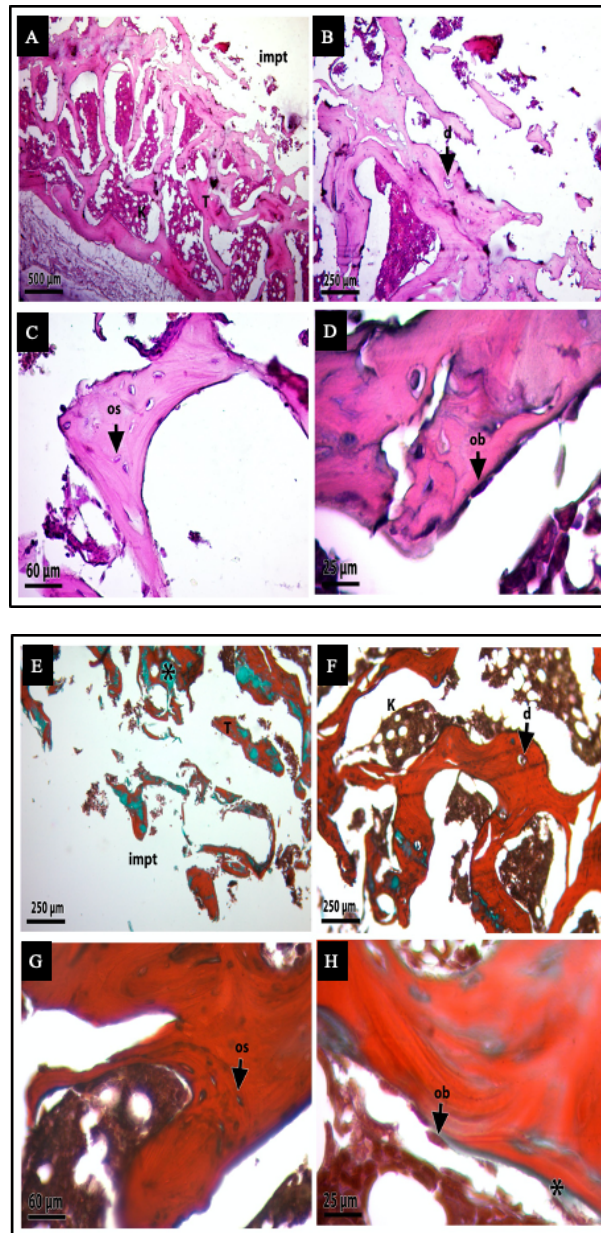
Mikroyapıda gözenek oranı ve fazların morfolojisi mekanik özellikleri etkileyen iki önemli faktördür. Bu kapsamda, numunelerin mekanik davranışını değerlendirmek için basma deneyi testleri yapılmıştır. Metalik malzemelerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi için genel olarak basma-çekme, mikrosertlik, aşınma, bükme ve yorulma gibi testlerin bir veya birkaçı numune durumlarına göre uygulanır. Ancak gözenekli numunelerde mikrosertlik ve aşınma testlerinin uygulanması ve sağlıklı sonuç alınması numunelerdeki gözeneklerin varlığı nedeniyle zordur. Bu çalışmada üretilen numuneler gözenekli ve implant malzemesi olarak kullanılmaları amaçlandığından vücut ortamında basma dayanımına maruz kalacakları için basma testleri ile mekanik dayanımları belirlenmeye çalışıldı. Numunelerin basma testi için olması gereken kesit ve boy oranında silindir numunelerde numune uzunluğunun kesitin en az 1.5 katı olacak şekilde (10x15 mm silindir) olmasına özen gösterilmiştir. Test esnasında basma basıncına karşı birim şekil değiştirme hızının 0.01 mm/saniye 0.1 mm/dakika olmasına özen gösterilmiştir. Az ve çok gözenekli numunelerin basma dayanımı-birim şekil değiştirme grafikleri şekil 6'da verilmiştir. 1200 °C'de 2 saat sinterlenen az gözenekli (%13.62) numunenin basma dayanımı ve birim şekil değiştirme değerleri sırasıyla 960 MPa ve %5.7 iken, bu değerler çok gözenekli (%56.32) numuneler için 70 MPa ve %2.7'dir. Bu sonuçlara göre gözenek oranının artması ile beklenildiği gibi numunenin basma dayanımının azaldığı anlaşılmaktadır. Gözenekli TiNbSn alaşımları için sinterleme sıcaklığının artması ile gözenek oranının azaldığı ve azalan gözenek oranı ile basma dayanımlarının arttığı daha önceki çalışmamızda da belirtilmektedir [29]. Sert doku için ideal implant malzemelerinin gözenek oranları %30'lardan başlamaktadır. İnsan kemiğinin gözenek oranı ise %30-%90 arasındadır. Ayrıca, gözenek boyutları ise 100 µm ila 500 µm arasındadır [18,20,30].

Çok gözenekli Ti-16Nb-4Sn alaşım numunesinin in vivo değerlendirme sonucu şekil 5'de gösterilmektedir. Bu sonuca göre implant materyali etrafındaki bölgelerde yabancı cisim reaksiyonu veya belirgin alerjik reaksiyon görülmemektedir. Bu bölgelerde damarlanmanın arttığı ve yeni kemik dokusunun implanta doğru ilerlediği görülmektedir. Kortikal kemik yıkımına dair bir kanıt olmamakla birlikte periostler, kemik dokunun dışında varlığını sergilemektedir. Ayrıca osteositler ve kemik doku hücreleri normal görünümündedir. Osteoblastik aktivitenin yer yer devam ettiği ve kemik trabeküllerinin etrafında yeni kemik oluşumu için matrisi sentezlediği görülmektedir. Kunii ve ark. [31] ve Tanaka ve ark. [32] tarafında sırasıyla Ti-25.4Nb-9.9Sn (kütle%) ve Ti-25Nb-11Sn (ağırlıkça%) alaşım numuneleri kullanılarak yapılan in vivo çalışmalarında benzer sonuçlar belirtilmektedir.

Gözenekli implant malzemeleri, implant numunesinin yapısındaki gözeneklerin oksijen ve besinlerin taşınmasını kolaylaştırmasından dolayı düşük gözenekli muadillerine kıyasla cerrahi amaçlar için avantajlıdır. Takemoto ve ark. [33] plazma püskürtme yöntemiyle ürettikleri farklı gözenek oranlarına sahip saf Ti implant numuneleri ile yaptıkları in vivo deneyler sonucunda gözenek oranı arttıkça numunelerin biyouyumluluk özelliklerinin arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, Taniguchi ve ark. [34] tarafından farklı gözenek boyutuna sahip Ti implant malzemeleri üzerine yapılan in vivo çalışmalarda gözenek boyutunun artmasıyla kemik büyümesinin daha hızlı olduğu belirtilmektedir. Benzer şekilde, Van ve ark. [35] tarafından gözenek boyutu 500 µm ve 1000 µm olarak üretilen Ti6Al4V implant numunelerinin in vitro deney sonuçlarına göre gözenek boyutunun artmasıyla birlikte hücre yoğunluğunda ve metabolik aktivitede önemli bir artış olduğu belirtilmektedir. Çok gözenekli Ti-16Nb-4Sn alaşımı iyi biyoaktivite ve mükemmel biyouyumluluk sergilemektedir. Bu özelliklerinden dolayı bu implant malzemelerin cerrahi koşullar için biyolojik olarak kullanılma potansiyelleri vardır.



Şekil 4. Farklı gözenekliliğe sahip gözenekli Ti-16Nb-4Sn örneklerinin basma dayanımı ve birim şekil değiştirme eğrileri, (a) %13.62 gözeneklilik, (b) %56.32 gözeneklilik
(Compressive strength and strain curves of porous Ti-16Nb-4Sn samples with different porosity): (a) 13.62% porosity (b) 56.32% porosity)



Şekil 5. Çok gözenekli Ti-16Nb-4Sn örneğinin implantasyondan sonraki histolojik görüntüsü. (A)-(D): Hematoksilin ve Eosin boyama; (E)-(H): Trikróm boyamanın Masson-Goldner görüntüleri (A, E x4; B, F x10; C, D, G ve H x40 büyütme). impt: İmplant bölgesi, T: kemik trabekülleri, K: kemik iliği, d: vasküler, os: osteosit, ob: osteoblast, *: yeni kemik oluşumu
(Histological image of the multiporous Ti-16Nb-4Sn specimen after implantation. (A)-(D): Hematoxylin and Eosin staining; (E)-(H): Masson-Goldner images of trichrome staining (A, E x4; B, F x10; C, D, G and H x40 magnifications). impt: Implant site, T: bone trabeculae, K: bone marrow, d: vascular, os: osteocyte, ob: osteoblast, *: new bone formation)

4. Sonuç ve Öneriler (Result and Recommendations)

Biyouyumluluk açısından az gözenekli ve ideal gözenekli (çok gözenekli) Ti-16Nb-4Sn alaşımları, sert doku implantı olarak kullanılmak üzere geleneksel toz sinterleme yöntemiyle üretilmektedir. SEM görüntülerinde açık gri ve koyu gri renkli olarak iki farklı yapıya ilaveten siyah renkli olarak gözeneklerin varlığı anlaşılmaktadır. SEM görüntülerinde EDX analizi sonucu bazı bölgelerde σ ve β fazlarının lamelli yapısının (Widmanstatten yapısı) varlığı dikkat çekmektedir. SEM-EDX analizlerine ilaveten XRD analiz sonuçlarında da yapının β ve α fazlarından oluştuğu tespit edildi. Çok gözenekli Ti-16Nb-4Sn alaşım numunesinin daha düşük mukavemete ve eğrilerde uzun bir plato alanına sahip olduğu görüldü. Çok gözenekli numunelerin basma dayanımı kemik yapısına göre daha düşüktür. Bu nedenle gözenek oranının %56.32'den daha aşağılara düşürülmesi ve böylece basma dayanımının artırılması gerekmektedir. İn vivo test sonuçlarına göre, fibröz bağ doku oluşumu ve implant örneği etrafında yeni kemik oluşumu iyi durumdadır. Üretilen numuneler biyolojik uyumluluklarından dolayı implant malzemesi olarak kullanılabilir için yüksek potansiyele sahiptir.

Teşekkür (Acknowledgment)

Bu çalışma, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: MÜFLTP/2017-0001). Destekleri için Adıyaman Üniversitesine teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması Beyanı (Conflict Of Interest Statement)

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar (References)

- [1] I. V. Okulov, A.V. Okulov, I.V. Soldatov, B. Luthringer, R. Willumeit-Römer, T. Wada, H. Kato, J. Weissmüller and J. Markmann, "Open porous dealloying-based biomaterials as a novel biomaterial platform," *Materials Science and Engineering C*, vol. 88, pp. 95-103, March 2018. doi:10.1016/j.msec.2018.03.008
- [2] A. E. Medvedev, A. Molotnikov, R. Lapovok, R. Zeller, S. Berner, P. Habersetzer and F.D. Torre, "Microstructure and mechanical properties of Ti-15Zr alloy used as dental implant material," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 62, pp. 384-398, September 2016. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.05.008
- [3] R.P. Verma, "Titanium based biomaterial for bone implants: A mini review," *Materials Today: Proceedings*, vol. 26, pp. 3148-3151, June 2020. doi:10.1016/j.matpr.2020.02.649
- [4] P. Xu, F. Pyczak, M. Yan, W. Limberg, R. Willumeit-Römer and T. Ebel, "Tensile toughening of powder-injection-molded β Ti-Nb-Zr biomaterials by adjusting TiC particle distribution from aligned to dispersed pattern," *Applied Materials Today*, vol. 19, pp. 1-14, June 2020. doi:10.1016/j.apmt.2020.100630
- [5] M. Vardaki, S. Mohajernia, A. Pantazi, I.C. Nica, M. Enachescu, A. Mazare, I. Demetrescu and P. Schmuki, "Post treatments effect on TiZr nanostructures fabricated via anodizing," *Journal of Materials Research and Technology*, vol. 6, pp. 5802-5812, December 2019. doi:10.1016/j.jmrt.2019.09.049.
- [6] L. Frauchiger, M. Taborrelli and P. Descouts, "Structural characterization of Ti₉₀Al₆V₄ alloy and sulphur segregation," *Applied Surface Science*, vol.115 (3), pp. 232-242, July 1997. doi: 10.1016/S0169-4332(96)01019-7
- [7] M. Niinomi, M. Nakai and J. Hieda, "Development of new metallic alloys for biomedical applications," *Acta Biomaterial*, vol. 8, pp. 3888-3903, November 2012. doi:10.1016/j.actbio.2012.06.037
- [8] C. Pengfei, J. Ran, Z. Fenggang, L. Jianghua and F. Tian, "Mechanical properties and corrosion behavior of b-type Ti-Zr-Nb-Mo alloys for biomedical application," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 842, pp. 155693, November 2020. doi:10.1016/j.jallcom.2020.155693
- [9] J.-Y. Rho, T.Y. Tsui and G.M. Pharr, "Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation," *Biomaterial*, vol. 18, pp. 1325-1330, October 1997. doi:10.1016/S0142-9612(97)00073-2.
- [10] S. Ozan, J.X. Lin, Y.C. Li, R. Ipek and C.E. Wen, "Development of Ti-Nb-Zr alloys with high elastic admissible strain for temporary orthopedic devices," *Acta Biomaterial*, vol. 20, pp. 176-187, July 2015. doi:10.1016/j.actbio.2015.03.023.
- [11] T.K. Jung, H.S. Lee, S. Semboshi, N. Masahashi, T. Abumiya and S. Hanada, "Mechanical properties graded Ti alloy implants for orthopedic applications," *Materials Science Forum*, vol. 631(632), pp. 205-210, January 2010. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.631-632.205
- [12] T.K. Jung, S. Semboshi, N. Masahashi and S. Hanada, "Mechanical properties and microstructures of beta Ti-25Nb-11Sn ternary alloy for biomedical applications," *Materials Science and Engineering C*, vol. 33, pp. 1629-1635, April 2013.

doi:10.1016/j.msec.2012.12.072

[13] K. Miura, N. Yamada, S. Hanada and T.K. Jung, "The bone tissue compatibility of a new Ti-Nb-Sn alloy with a low Young's modulus," *Acta Biomaterial*, vol. 7, pp. 2320–2326, May 2011. doi:10.1016/j.actbio.2011.02.008

[14] E. Yılmaz, A. Gökçe, F. Findik and H.O. Gülsoy, "Powder metallurgy processing of Ti-Nb based biomedical alloys," *Acta Physica Polonica A*, vol. 134, pp. 278–280, 2018. doi:10.12693/APhysPolA.134.278

[15] O. R.M. Khalifa, E. Wahab and A. Tilp, "The effect of Sn and TiO₂ nano particles added in electroless Ni-P plating solution on the properties of composite coatings," *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 5(6), pp. 136–144, 2011.

[16] X. Rao, C.L. Chun and Y.Y. Zheng, "Phase composition, microstructure, and mechanical properties of porous Ti-Nb-Zr alloys prepared by a two-step foaming powder metallurgy method," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 34, pp. 27–36, June 2014. doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.02.001

[17] P.E.L. Moraes, R.J. Contieri, E.S.N. Lopes, A. Robin and R. Caram, "Effects of Sn addition on the microstructure, mechanical properties and corrosion behavior of Ti-Nb-Sn alloys," *Materials Characterization*, vol. 96, pp. 273–281, October 2014. doi:10.1016/j.matchar.2014.08.014

[18] M. Kaya, A. Yolun, O. Çakmak, F. Yakuphanoglu, E. Elibol, M. Köm ve M. Güvenç, "Biyomedikal uygulamalar için titanyum esaslı gözenekli TiNb alaşımının üretimi," *Nevşehir Bilim Teknoloji Dergisi*, cilt 7, ss. 49-59, 2018. doi:10.17100/nevbitlek.417354

[19] M. Kılıç, "Toz metalürjisi ile üretilen NiTi alaşımına Al'un etkisi", *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, cilt 10(1), ss. 256-267, 2021. doi:10.17798/bitlisfen.841400

[20] M. Kaya and F. Yakuphanoglu, "A study on microstructure of porous TiNbZr alloy produced as biomaterial," *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, vol. 50, pp. 742–746, 2019. doi:10.1002/mawe.201800235

[21] M. Kaya, F. Yakuphanoglu, E. Elibol and M. Köm, "Microstructure characterization and biocompatibility behaviour of TiNbZr alloy fabricated by powder metallurgy," *Materials Research Express*, vol. 6, pp. 1–12, 2019. doi:10.1088/2053-1591/ab58a5.

[22] Ö. Çakmak, "TiNbSn alaşımının toz metalürjisi ile üretimi ve biyouyumluluk özelliğinin incelenmesi," Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi, Adıyaman, Türkiye 2017.

[23] E. Yılmaz, A. Gökçe, F. Findik and H.O. Gülsoy, "Characterization of biomedical Ti-16Nb-(0-4)Sn alloys produced by Powder Injection Molding," *Vacuum*, vol. 142, pp. 164–174, August 2017. doi:10.1016/j.vacuum.2017.05.018

[24] D. Zhao, K. Chang, T. Ebel, H. Nie, R. Willumeit and F. Pyczak, "Sintering behavior and mechanical properties of a metal injection molded Ti-Nb binary alloy as biomaterial," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 640, pp. 393–400, August 2015. doi:10.1016/j.jallcom.2015.04.039

[25] G. Xie, H. Kanetaka, H. Kato, F. Qin and W. Wang, "Porous Ti-based bulk metallic glass with excellent mechanical properties and good biocompatibility," *Intermetallics*, vol. 105, pp.153–162, February 2019. doi: 10.1016/j.intermet.2018.12.002

[26] M.K. Ibrahim, E. Hamzah and S.N. Saud, "Microstructure, phase transformation, mechanical behavior, bio-corrosion and antibacterial properties of Ti-Nb-xSn (x = 0, 0.25, 0.5 and 1.5) SMAs," *Journal of Materials Engineering and Performance*, vol. 28, pp. 382–393, November 2018. doi:10.1007/S11665-018-3776-X

[27] P. Li, X. Ma, D. Wang and H. Zhang, "Microstructural and mechanical properties of β -Type Ti-Nb-Sn biomedical alloys with low elastic modulus," *Metals*, vol. 9, pp. 1–16. June 2019. doi:10.3390/met9060712

[28] J. Sun, Q. Yao, H. Xing and W.Y. Guo, "Elastic properties of β , α' and ω metastable phases in Ti-Nb alloy from first-principles," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 19, pp. 1–8, 2007. doi:10.1088/0953-8984/19/48/486215

[29] Ö. Çakmak and M. Kaya, "Effect of sintering procedure on microstructure and mechanical properties of biomedical TiNbSn alloy produced via powder metallurgy," *Applied Physics A*, vol. 127, pp. 561–570, June 2021. doi:10.1007/s00339-021-04678-4

[30] A. Nouri, P.D. Hodgson and C.E. Wen, "Effect of process control agent on the porous structure and mechanical properties of a biomedical Ti-Sn-Nb alloy produced by powder metallurgy," *Acta Biomaterials*, vol. 6, pp. 1630–1639, April 2010. doi:10.1016/j.actbio.2009.10.005

[31] T. Kunii, Y. Mori, H. Tanaka, A. Kogure, M. Kamimura, N. Mori, S. Hanada, N. Masahashi and E. Itoi, "Improved osseointegration of a TiNbSn alloy with a low Young's modulus treated with anodic oxidation," *Science Report*, vol. 9, pp. 1–10, September 2019. doi:10.1038/s41598-019-50581-7.

[32] H. Tanaka, Y. Mori, A. Noro, A. Kogure, M. Kamimura, N. Yamada, S. Hanada, N. Masahashi and E. Itoi, "Apatite formation and biocompatibility of a low Young's modulus Ti-Nb-Sn alloy treated with anodic oxidation and hot water. *PLoS One*, vol. 11(2), pp. 1–14, February 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0150081

[33] M. Takemoto, S. Fujibayashi, M. Neo, J. Suzuki, T. Kokubo and T. Nakamura, "Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 6014–6023, October 2005. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.019

[34] N. Taniguchi, S. Fujibayashi, M. Takemoto, K. Sasaki, B. Otsuki, T. Nakamura, T. Matsushita, T. Kokubo and S. Matsuda, "Effect

of pore size on bone ingrowth into porous titanium implants fabricated by additive manufacturing: an in vivo experiment,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 59, pp. 690–701, February 2016. doi:10.1016/j.msec.2015.10.069

[35] S. V. Bael, Y.C. Chai, S. Truscetto, M. Moesen, G. Kerckhofs, H.V. Oosterwyck, J.P. Kruth and J. Schrooten, “The effect of pore geometry on the in vitro biological behavior of human periosteum-derived cells seeded on selective laser-melted Ti6Al4V bone scaffolds,” *Acta Biomaterials*, vol. 8, pp. 2824–2834, July 2012. doi:10.1016/j.actbio.2012.04.001

This is an open access article under the CC-BY license

